

KURZMITTEILUNGEN

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 390, Juli 1969

Automatische enzymatische Galaktosebestimmung im Vollblut

Automatic enzymic determination of galactose in whole blood

Von J. D. KRUSE-JARRES und V. KLINGMÜLLER

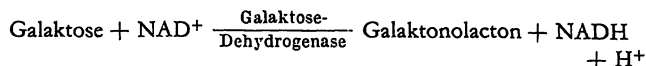
*Klin. Chem. Institut, Klinikum Mannheim der Universität
Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. Dr. V. Klingmüller)*

(Eingegangen am 11. April 1969)

Kürzlich wurde in Arbeiten von TENGSTRÖM und Mitarbeitern (1), HJELM und Mitarbeitern (2), ROMMEL und Mitarbeitern (3) und MEHNERT und Mitarbeitern (4) auf die Bedeutung der Galaktosebelastungsprobe für die Differenzierung hepatogener Erkrankungen hingewiesen. Da sich durch eine neue Testpackung (TCGA 15291 TGAN Boehringer Mannheim GmbH) eine spezifische und unkomplizierte Bestimmung der Galaktose anbietet, muß der sehr wesentlichen Abklärung von Lebererkrankungen durch Galaktosebelastungsproben eine zunehmende Bedeutung beigemessen werden.

Methodik

Wir stellen eine Methode vor, durch welche eine autoanalytische Bestimmung der Galaktose als UV-Test möglich ist. Die Bestimmung beruht auf der Reaktion:



Jeweils 3,4 ml heparinisiertes Vollblut werden durch eine Rotationspumpe von einem Probennehmer (beide Fa. Technicon) im Rhythmus 40—2/1 angesaugt. Jeder 2. Probenbecher ist mit

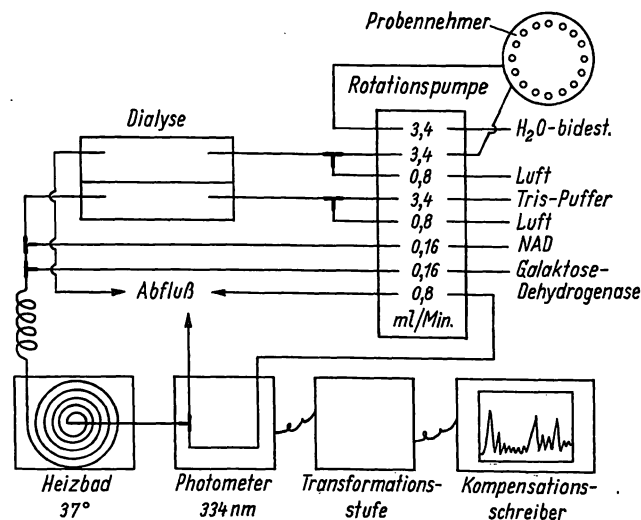


Abb. 1. Fließdiagramm

dest. Wasser gefüllt, so daß sich eine Probenanalysezahl von 20/Std. ergibt. Das heparinisierte, ansonsten unverdünnte Vollblut wird in der anschließenden Dialyse (Fa. Technicon) gegen einen 0,1M Tris-Puffer, pH 8,6 dialysiert. Dem Dialysat wird anschließend zunächst NAD (4 g/l 86% β -NAD; Zufuhr 0,16 ml/Min.) und gleich darauf β -Galaktose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.48) (etwa 5 U/mg; 32,5 mg/l; Zufuhr 0,16 ml/Min.) zugeführt. Dem nachfolgenden Heizbad ist eine Mischschlange vorgebaut. Im Heizbad (Fa. Technicon) wird das Reaktionsgemisch während

einer Durchflußlänge von 12 m auf 37° erwärmt. Es folgt die Messung der der Galaktosekonzentration äquivalenten NADH-Menge in einer 10 mm-Durchflußküvette durch das Photometer (Eppendorf) bei 334 nm. Die Extinktion wird über eine Transformatorstufe (E = 0—0,25) vom Kompensationsschreiber (beide Eppendorf) aufgezeichnet (siehe Fließdiagramm).

Zur Eichung werden wäbr. Galaktoselösungen von 0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5 und 2,0 g/l verwandt. Der Konzentrationsbereich bis 2,0 g/l erweist sich bei oralen (40 g) sowie intravenösen (0,33 g/kg KG) Galaktosebelastungen als ausreichend. Der Normalbereich bis 0,045 g/l im menschlichen Blut kann mit dieser Methode gut erfaßt werden. Konzentrationen von 0,005 g/l sind noch meßbar.

Ergebnisse

Zur Bestimmung der Präzision werden Standardabweichung (s) und Variationskoeffizient (V) von 8 wäbr. Galaktoselösungen sowie 2 Blutproben jeweils 10 Bestimmungen in der Serie durchgeführt (s. Tab. 1). Dabei errechnet sich mit zunehmender Konzen-

Tab. 1
Standardabweichung und Variationskoeffizient

Galaktose g/l	Streuung der wieder- gefundenen Galaktose g/l	V %
wäbrige Lösungen:		
0,05	± 0,002	4,0
0,10	± 0,003	3,2
0,25	± 0,007	2,8
0,50	± 0,009	1,8
0,75	± 0,010	1,3
1,00	± 0,013	1,3
1,50	± 0,017	1,1
2,00	± 0,021	1,1
Blutproben:		
0,046	± 0,002	4,3
0,038	± 0,002	5,2

tration ein abnehmender Variationskoeffizient. Der relativ hohe Variationskoeffizient in Bereichen bis 0,1 g/l Galaktose resultiert aus der Wahl des sehr niedrigen Extinktionsbereiches (0—0,25). Dieser ist mit der Überlegung gewählt, die Kosten für das relativ teure Enzym und Coenzym durch entsprechende Verdünnungen ohne wesentliche Einbuße der Analysengenauigkeit so niedrig wie möglich zu halten und den Test somit als praktikabel in der Klinikroutine zu gestalten. Galaktose-Dehydrogenase und NAD müssen — um eine kontinuierliche Zufuhr zu gewährleisten — stark verdünnt werden und die Pumpenschläuche entsprechend groß gewählt werden, wenn davon ausgegangen wird, daß 3,4 ml Vollblut/Min. zur Bestimmung verwandt werden. Nur so ist es möglich, mit dem Galaktose-Dehydrogenase-Anteil einer Testpackung (0,65 ml = 3,25 mg) etwa 100—120 Bestimmungen durchzuführen.

Über die Möglichkeit kontinuierlicher Analysen in Form von Galaktogrammen soll an anderer Stelle berichtet werden. Der Fa. Boehringer Mannheim GmbH gilt unser Dank für die Galaktose-Dehydrogenase und das NAD. Der Fa. Technicon und der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei Dank für apparative Unterstützung. Fräulein B. PAPNER und Herrn R. BALKENHOL danken wir für ihre technische Assistenz.

Literatur

1. TENGSTRÖM, B., M. HJELM, C. H. DE VERDIER und I. WERNER, Amer. J. Dig. Dis. 12, 853 (1967). — 2. HJELM, M. Clin. Chim. Acta, Amsterdam 15, 87 (1967). — 3. ROMMEL, K., E. BERNT, F. SCHMITZ und K. GRIMMEL, Klin. Wschr. 46, 936 (1968). — 4. MEHNERT, H., M. HASLBECK und H. FÖRSTER, Dtsch. med. Wschr. 93, 1899 (1968).

Dr. J. D. Kruse-Jarres
68 Mannheim, Postfach 23

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 391—392, Juli 1969

Eine Einrichtung zur Darstellung und Photodokumentation von Agar-Gel-Enzym-Elektropherogrammen

*Equipment for the visualisation and photodocumentation of agar
gel electropherograms*

Von J. KAMARÝT

*Aus dem Forschungsinstitut für Pädiatrie,
(Direktor: Prof. MUDr. Z. Brunecký, C. Sc.)
Brno (CSSR)*

(Eingegangen am 9. Mai 1969)

Die Möglichkeit der densitometrischen Registrierung von Isoenzymaktivitäten, die mit dem Prinzip des optischen Tests nach Warburg dargestellt wurden, mit Hilfe des Transparenz-Photometers bei 366 nm, wird sehr häufig benutzt wegen ihrer Genauigkeit und Empfindlichkeit.

Während die Lichtabsorption von NADH₂ im UV-Bereich, deren Zunahme oder Abnahme als Maß der Enzymaktivität dient, mit bloßem Auge unsichtbar ist, ist es möglich, für das Sichtbarmachen der Isoenzym-Fractionen die zweite Eigenschaft, und zwar die Fluoreszenz des NADH₂ auszunutzen.

Die Agar-Gel-Schicht, welche NADH₂ enthält, emittiert Fluoreszenz nach Bestrahlung mit UV-Licht (z. B. der Wellenlänge 366 nm). In der Zone, in der die Enzymreaktion abgelaufen ist, nimmt diese Fluoreszenz ab infolge Oxydation des NADH₂ oder verschwindet ganz. Die Fluoreszenz wird mit einer Quecksilberdampf-Hochdrucklampe angeregt; die emittierte Fluoreszenzstrahlung ermöglicht die Sichtbarmachung. Ohne Abschirmung des UV Lichtes, welches die Augen schädigt, ist aber die Beobachtung sehr schwierig.

Für die visuelle Beobachtung des Reaktions-Verlaufes im Agar-Gel wurde deshalb ein einfaches Gerät konstruiert, welches nach Abfiltrieren der emittierten Fluoreszenzstrahlung zugleich als Gerät für die Dokumentation der Enzym-Elektropherogramme auf Photopapier dient.

Das Gerät besteht aus dem Gehäuse, in das eine Quecksilberdampf-Hochdrucklampe (HQV 125 W, 1,5 A), deren Glaskolben ein Filter für das Licht der Wellenlänge 366 nm darstellt, eingebaut wird. Diese Lampe wird über eine Drossel angeschlossen und unten mit einem Reflektor ausgerüstet. Die Seiten des Gehäuses werden mit Kunststoffgittern versehen, um die durch den Quecksilberbrenner entwickelte Wärme mit Hilfe eines kleinen Ventilators absaugen zu können. Der Ventilator ist über einen Transformator und eine Germanium-Diode als Gleichrichter angeschlossen. Die Schalter für Ventilator und Quecksilberlampe befinden sich an der rechten Wand des Gehäuses. Der elektrische Aufbau des Gerätes ist aus Schema (Abb. 1) ersichtlich.

Das Gehäuse wird mit einem abnehmbaren Deckel, mit einer rechteckigen Öffnung in der Mitte, ausgerüstet. Diese Öffnung befindet sich direkt über der Entladungsbahn der Hg-Lampe und ist mit einer Verschlussklappe, welche mit dem Drehknopf auf der rechten Seite des Gerätes bewegt wird, versehen. Auf dem Deckel befindet sich eine schwarze Platte, mit einem Fenster derselben Größe, wie die Deckel-Öffnung. In dieses Fenster sind vier übereinander liegende gleiche Matt-Glasscheiben eingesetzt, die zur Lichthomogenisierung dienen. Über der Platte mit dem Mattglasscheibensystem befindet sich eine zweite Platte mit der Falzöffnung zum Einsetzen des Objektträgers (76 × 26 mm) mit der feuchten elektrophoretischen Agar-Gel-Schicht, welche mit der Detektionsschicht, die das entsprechende Substrat und NADH₂ bzw. NAD enthält, bedeckt ist. In diesem Sandwich läuft die Enzym-Reaktion ab.

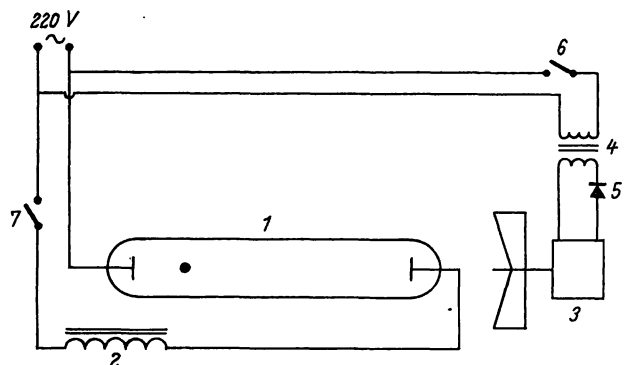


Abb. 1

Elektrischer Aufbau des beschriebenen Apparates

1. Quecksilberdampf-Hochdrucklampe HQV 125 W, 1,15 A
2. Vorschaltgerät — Drosselspule
3. Ventilator 8 V
4. Transformator 220 V / 8 V
5. Gleichrichter — Germanium-Diode
6. Ventilator-Schalter
7. Quecksilberdampf-Hochdrucklampen-Schalter

Nach Einschalten und Einbrennen der Hg-Lampe kann man in den Zonen, wo die Enzymreaktion abgelaufen ist oder noch abläuft, das Auslöschten der Fluoreszenz beobachten. Enzymbanden sind so als dunkle Fractionen sichtbar.

Die photographische Dokumentation ist aber mit dieser Einrichtung nicht gut möglich. Für dieses Ziel dient der Zusatz, welcher auf dem Schema (Abb. 2) mit der gestrichelten Linie gekennzeichnet

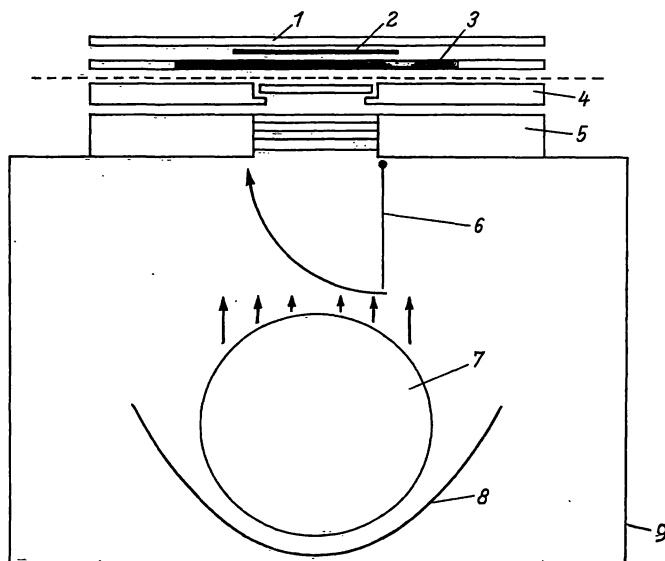


Abb. 2

Optischer Aufbau des beschriebenen Apparates

1. Andruckplatte für Photopapier
2. Photopapier
3. Platte mit Filter 366 nm
4. Platte für Einsetzen des Enzym-Elektropherogramms
5. Platte mit dem Mattscheiben-System
6. Lichtverschlussklappe
7. Quecksilberdampf-Hochdrucklampe
8. Reflektor
9. Gehäuse

Die Teile 1, 2 und 3, welche mit der gestrichelten Linie gekennzeichnet sind, bilden den Ansatz für die Photodokumentation.

zeichnet wird. Die Platte mit dem Enzym-Elektropherogramm wird mit dem in eine dünne schwarze Kunststoffplatte eingebauten Glasfilter (Woodsches Glas — Schott, Jena — zur Isolierung der Wellenlänge 366 nm) bedeckt. Auf das Filter legt man das Photopapier (Qualität Ultra-hart), welches durch eine zweite schwarze Kunststoffplatte fest angedrückt wird. Die Belichtung führt man durch kurzes Ein- und Ausschalten (ein Sekundenbruchteil) durch. Danach wird das Papier in einem kontrast arbeitenden Entwickler entwickelt.

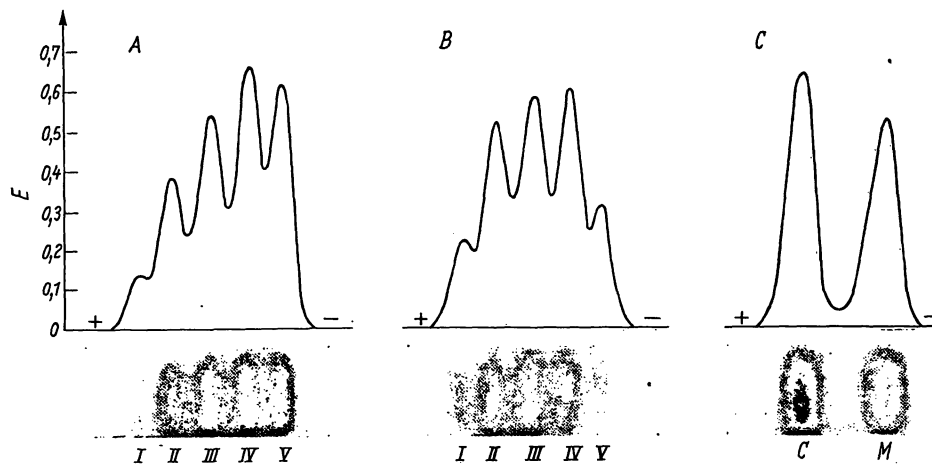


Abb. 3

Dokumentation der LDH-(Lactatdehydrogenase) und GOT-(Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) Isoenzyme auf dem Photopapier mit densitometrischer Registrierung (550 nm)

- A. LDH-Isoenzyme. Neutrophile Granulozyten. Akute myeloische Leukämie—95,4% Neutrophile.
- B. LDH-Isoenzyme. Lymphocyten. Lymphatische Leukämie—96,2% Lymphocyten.
- C. Leberhomogenat. C—cytoplasmatische Fraktion; M—mitochondriale Fraktion der GOT.

Als Beispiel wird die Dokumentation der Lactatdehydrogenase und Aspartataminotransferase-Isoenzyme in Abbildung 3 gezeigt. Die Enzym-Elektropherogramme auf dem Photopapier kann man mit Hilfe geläufiger Densitometer mit Auflicht-Einrichtung qualitativ auswerten.

Das Gerät ermöglicht:

1. Visuelle Kontrolle des Reaktionsverlaufes (sofern der optische Test nach Warburg benutzt wird) vor der eigentlichen densitometrischen Registrierung der Aktivitäten bei der Wellenlänge 366 nm.
2. Dokumentation der Enzym-Elektropherogramme auf Photopapier und die densitometrische Registrierung der Isoenzymaktivitäten im sichtbaren Wellenbereich (z. B. bei 550 nm).

Der Vorteil dieses Gerätes ist die volle Ausnutzung des optischen Tests nach Warburg für die Detektion der Isoenzymaktivitäten ohne Kopplung mit anderen Farbreaktionen. Diese Indikatorreaktionen sind kostspielig, nicht so empfindlich und schwache Isoenzymaktivitäten (wie z. B. Serum-LDH₄ oder -LDH₅) werden manchmal übersehen.

Die Gefahr der Augenschädigung des Laborarbeiters mit kurzwelligem Licht wird bei richtiger Handhabung des beschriebenen Gerätes auf ein Minimum verringert.

RNDr. Jaromír Kamarýt, C. Sc.
Forschungsinstitut für Pädiatrie
Černá Pole, Černopolský 9
Brno, Tschechoslowakei

BUCHBESPRECHUNGEN

Dekorporierung radioaktiver und stabiler Metallionen. Von A. CATSCH. VIII, 57 Abb., 28 Tab., DM 32,—.

Verlag Karl Thieme KG, München (1968).

Die Monographie von ALEXANDER CATSCH über die „Dekorporierung radioaktiver und stabiler Metallionen“ befaßt sich auf 176 Seiten mit einer theoretisch sehr interessanten Arbeitsrichtung der experimentellen Medizin: Der Mobilisierung von radioaktiven Metallionen im Organismus durch Chelatbildner. Wenn auch die Fälle von Inkorporationen radioaktiver Metallionen selbst bei Reaktor-Arbeitern bisher extrem selten waren, ist es doch grundsätzlich bedeutsam, daß einiges theoretisches Rüstzeug für die Behandlung derartiger Fälle nunmehr vorliegt. Unter diesem Gesichtspunkt erklärt sich auch der Zusatz im Titel des Buches „Therapeutische Grundlagen“.

Dennoch liegt der Schwerpunkt der Monographie bei der Schilderung der experimentellen Grundlagen, so wie sie durch Tierversuche, hauptsächlich unter der speziellen Sicht des Autors, gewonnen wurden.

Während das vorliegende Buch im allgemeinen wohl nur für ausgesprochene Spezialisten in Frage kommt, ist die ausführliche Einführung in die Chemie der Chelatbildner für den anorganisch arbeitenden Biochemiker ein vielleicht interessanter Aspekt.

M. Wenzel, Berlin

FEBS 4th Meeting Proceedings Vol. 4: Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism. Hrsg. GRAN. 116 S. 50 sh.

Academic Press Inc. (London) Ltd. (1968).

Dieses Buch enthält Vorträge, die am 5. Juli 1965 während der 4. Sitzung der „Federation of European Biochemical Societies“ in Oslo gehalten wurden. Die Vorträge sind sehr gut überarbeitet gedruckt, enthalten eine Fülle von Ergebnissen, die durch Schemata und Tabellen anschaulich wiedergegeben werden und bieten darüber hinaus eine reichliche Literaturauswahl. Im einzelnen berichten F. LYNEN und Mitarbeiter über die Biosynthese der Fettsäuren, A. T. JAMES über die Biosynthese ungesättigter Fettsäuren in Photosynthesesystemen niederer und höherer Pflanzen, I. B. FRITZ über die Beeinflussung des Stoffwechsels durch die Wirkung des Carnitins auf die Oxydation langkettiger Fettsäuren, J. BREMER über die Faktoren, die die carnitinabhängige Oxydation von Fettsäuren beeinflussen und L. L. M. van DEENEN und Mitarbeiter über die strukturellen und metabolischen Aspekte bei Fettsäuren in Phosphoglyceriden. Die Qualität der Vorträge läßt entsprechend den angeführten Autoren nichts zu wünschen übrig. Das Buch vermittelt zweifellos eine Fülle neuer Ergebnisse und kann darüber hinaus sogar zum Nachschlagen empfohlen werden.

H.-J. Merker, Berlin

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen und dgl. in dieser Zeitschrift berechtigt nicht zu der Annahme, daß solche Namen ohne weiteres von jedermann benutzt werden dürfen. Vielmehr handelt es sich häufig um gesetzlich geschützte Warenzeichen, auch wenn sie nicht eigens als solche gekennzeichnet sind.

© 1969 by Verlag Walter de Gruyter & Co., vormals G. J. Göschen'sche Verlagshandlung, J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung, Georg Reimer, Karl J. Trübner, Veit & Comp., 1 Berlin 30, Genthiner Str. 13. — Printed in Germany. — Satz und Druck: Walter de Gruyter & Co., 1 Berlin 30. Anzeigenverwaltung: Merkur-Werbung, Dr. K. Jeserich KG, 5213 Spich/Troisdorf, Merkur-Haus, Hauptstraße 23—27, Tel. (02241) 77051, FS. 08/85386. Für den Anzeigenteil verantwortlich: Dr. Peter Bohrer, Spich/Troisdorf.

Dieser Ausgabe liegt ein Prospekt der Dr. Edmund Halm GmbH, 4 Düsseldorf, Tonhallenstr. 11, bei. Wir bitten unsere Leser um freundliche Beachtung.